



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

## Anti-HA Affinity gel 亲和凝胶

货号: R32138

规格: 0.5ml, 1ml

保存温度: 2-8°C, 有效期 12 个月。

### 产品信息:

HA 标签亲和凝胶, 由高品质的 HA 小鼠单抗与琼脂糖凝胶共价偶联制成, 具有高载量 (至少为 1.2mg protein/ml 凝胶悬液), 高特异性, 性质稳定, 可反复使用的特点, 可用于 HA 标签融合蛋白的亲纯化及免疫 (共) 沉淀。

### 性能指标:

应用范围	可用于 Met 修饰的 N 端 HA 融合蛋白 (Met-HA-Protein), N 端 HA 融合蛋白 (HA-Protein) 和 C 端 HA 融合蛋白 (Protein-HA) 的亲纯化及免疫 (共) 沉淀。
抗体属性	小鼠单克隆抗体。
载量	1ml 琼脂糖颗粒, 共价偶联 6mg Anti-HA 小鼠单克隆抗体, 可纯化或沉淀至少 1.2mg HA 融合蛋白。
强度	可反复使用 3 次以上。
成分	1ml 共价偶联 Anti-HA 单克隆抗体的琼脂糖颗粒, 溶于 2ml PBS 中。

### 使用说明 (仅供参考):

使用目的	使用要求	使用方法
IP/CoIP		见应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 HA 标签蛋白质
亲和纯化	1. 目标蛋白遇酸不稳定 2. 要求纯化柱反复使用 3. 接受高成本纯化	见应用二. HA 多肽亲和纯化 HA 标签蛋白质
亲和纯化	1. 目标蛋白比较稳定 2. 不要求纯化柱反复使用 3. 不接受高成本纯化	见应用三. 酸洗脱亲和纯化 HA 标签蛋白质
细胞裂解液选择		



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

HA 标签蛋白质在细胞内表达	见 细胞裂解液制备 也可使用其它细胞裂解液来裂解细胞
HA 标签蛋白质在细胞外分泌表达	表达量高可以直接纯化, 表达量低请浓缩后纯化

### 需自备试剂及设备

离心机, 1.5mL 离心管若干, 重力纯化柱 (大量纯化需要)

细胞裂解液, 酸性洗脱液, 中和液, PBS, 2x 蛋白上样缓冲液, HA 多肽  
待测抗原样品及检测抗体

### 使用实例:

#### 应用一. 免疫 (共) 沉淀法检测 HA 标签蛋白质

1) 重悬 Anti-HA 亲和凝胶至均一, 转移 20 $\mu$ L 混合液(约含 10 $\mu$ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 100 $\mu$ L) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。

2) 加入 50-200 $\mu$ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 HA-tag 蛋白是否存在残留)。

4) 清洗凝胶, 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。

5) 加入 100 $\mu$ L 2x 上样缓冲液, 煮沸 5min, 冷却至室温并离心。取上清进行 SDS-PAGE 或 Western Blotting 检测。

#### 应用二. HA 多肽亲和纯化 HA 标签蛋白质

1) 重悬 Anti-HA 标签亲和凝胶至均一, 转移 40 $\mu$ L 混合液(约含 20 $\mu$ L 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200 $\mu$ L) 1x PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。

2) 加入 50-200 $\mu$ L 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2hr 或者 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。



3) 离心分离凝胶, 将上清液转移到新的 EP 管中备用 (上清液可用于检测 HA-tag 蛋白是否存在残留)。

4) 加入 10 倍凝胶 1xPBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。

5) 将 2 倍凝胶体积, 浓度为 2mg/mL HA 多肽溶液分几次加入上述沉淀, 4℃摇床孵育 2 h 后 (为了提高洗脱效率, 可延长孵育时间或重复洗脱), 离心收集上清。如有必要, 重复本步骤 1-3 次。将几次分离的上清分管收集。合并洗脱液。

备注: 根据蛋白质洗脱难易程度, 调整 HA 多肽溶液, 最高可到 5mg/ml。

6) 亲和凝胶如需重复使用, 需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 PBS 清洗, 再用适量 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗, 最后加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 至凝胶中, 混合均匀, 保存在-20℃。

注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

### 应用三. 酸洗脱亲和纯化 HA 标签蛋白质

1) 重悬 Anti-HA 标签亲和凝胶至均一, 转移 40μL 混合液(约含 20μL 凝胶)至离心管中, 加入 10 倍凝胶体积 (约 200μL) PBS, 5000rpm x 30sec, 弃上清, 重复该步骤清洗凝胶三次。

2) 加入 50-200μL 含有目标蛋白的真核细胞裂解液, 室温摇床孵育 2h 或者 4℃孵育过夜。

3) 加入 10 倍凝胶 PBS, 用上述离心法清洗凝胶三次; 预冷的 5 倍凝胶体积 pH 5.0 酸性预洗液洗涤凝胶, 除去非特异性结合蛋白。离心, 弃上清。

4) 预冷的 10 倍凝胶体积 pH 3.0 的酸性洗脱液进行洗脱, 收集管中预先放入中和液 10μl。注意: 酸性环境会缩短凝胶的使用寿命, 应尽量缩短凝胶与酸性洗脱液的接触时间, 不超过 10min。

5) 用紫外检测仪测定收集峰, 合并收集峰。



上海源叶生物科技有限公司  
Shanghai yuanye Bio-Technology Co., Ltd  
电话: 021-61312973 传真: 021-55068248  
网址: [www.shyuanye.com](http://www.shyuanye.com)  
邮箱: [shyysw@sina.com](mailto:shyysw@sina.com)

6) 亲和凝胶如需重复使用, 需依次用 10 倍凝胶体积的酸性洗脱液、10 倍凝胶体积的中和液、10 倍凝胶体积的 1xPBS 清洗, 再用适量 1xPBS (含 50% 甘油, 0.2%叠氮钠) 清洗, 最后加入与凝胶等体积的 1xPBS (含 50%甘油, 0.2%叠氮钠) 至凝胶中, 混合均匀, 保存在-20℃。

7) SDS-PAGE 鉴定蛋白质纯度及浓度, 并按照需求处理和保存蛋白质。

### 细胞裂解液制备

1) 悬浮细胞和半贴壁细胞从细胞培养瓶上吹下来后放入离心管中, 1000rpm 离心 5 分钟。贴壁细胞用细胞刮子轻轻从瓶壁上刮下来, 放入离心管中 1000rpm 离心 5 分钟。

2) 预冷的 1x PBS 重悬细胞, 1000rpm 离心 3min, 弃上清。重复一次。

3) 根据细胞的量加入相应体积的细胞裂解液, (例如: T75 细胞瓶底部细胞汇合度大于 90%, 一般约  $0.5-1 \times 10^7$  细胞, 需要加入 1ml 细胞裂解液)。反复吹打后冰上放置 10-20min, 让细胞充分裂解。

4) 用超声破碎仪将细胞裂解液超声, 直至细胞裂解液透明, 不再粘稠。冰上放置 30min 之后, 12000rpm, 4℃离心 10min。取上清, -80℃冷冻保存。

### 注意事项:

(1) 本产品含 50%甘油和 0.2%叠氮钠的 PBS 保存液中, 需冷藏条件下运输。

(2) 勿干燥凝胶, 勿使用超声处理凝胶, 勿使酸处理凝胶时间超过 10min。

(3) 以上使用方法中的凝胶用量, 均为少量制备的示范用量, 具体用量请根据实际情况调整。

(4) 本品仅用于科学研究, 不可用于诊断及治疗。